

## ATP-柠檬酸裂解酶（ATP-citrate lyase, ACL）试剂盒说明书

（货号：G0817W 微板法 96 样）

### 一、产品简介：

ATP-柠檬酸裂解酶（ACL, EC 4.1.3.8）是糖代谢和脂肪酸生物合成的关键酶，其作用底物和产物是糖代谢中的关键中间产物，并可作为脂肪酸合成的底物；同时在植物的生长发育以及提高植物抗逆性方面发挥了重要作用。此外，ACL也是三羧酸循环的关键酶。

ACL在ATP和辅酶A存在的情况下催化柠檬酸裂解为乙酰辅酶A、草酰乙酸、腺苷二磷酸和磷酸盐。苹果酸脱氢酶进一步催化草酰乙酸和NADH生成苹果酸和NAD<sup>+</sup>，在340nm测定NADH减少速率，即可得到ACL酶活性大小。

### 二、试剂盒组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体120mL×1瓶	4℃保存	
试剂一	EP管×1支	-20℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部，再加1.1mL蒸馏水溶解，仍-20℃保存。
试剂二	液体15mL×1瓶	4℃保存	
试剂三	粉体mg×4支	-20℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部，每支加1.9mL蒸馏水溶解。用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融，三天内用完。

### 三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96孔板、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

### 四、ATP-柠檬酸裂解酶（ACL）活性测定：

建议正式实验前选取2个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

#### 1、样本制备：

##### ① 组织样本：

称取约0.1g组织（水分充足的果实样本可取0.5g），加1mL提取液，进行冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

**【注】：**也可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为1：5~10的比例进行提取。

##### ② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取500万细菌或细胞加入1mL提取液；超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率20%或200W，超声3s，间隔10s，重复30次）；12000rpm，4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

**【注】：**若增加样本量，可按照细菌或细胞数量（10<sup>4</sup>个）：提取液体积（mL）为1000~5000：1的比例进行提取

##### ③ 液体样品：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

#### 2、上机检测：

① 酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，温度可以设定为25℃。

② 刚从低温下拿出的试剂二和三可在25℃水浴锅中孵育10min。

③ 在96孔板中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管
样本	10
试剂一	10
试剂二	110
试剂三	70
混匀, 室温 (25℃) 下立即在 340nm 处读取吸光值 A1, 10min 后再读取 A2, $\Delta A = A1 - A2$ 。	

- 若  $\Delta A$  差值在零附近徘徊, 可以延长反应时间 10min 到 30min, 则相应的反应时间 T 则代入计算公式重新计算;  
或者加大样本上样量 (如: 由 10μL 增加到 20μL, 则试剂三相应减少, 保持总体积 200μL 不变), 改变后的加样体积即 V1 代入计算公式重新计算;  
或者由 0.1g 样本取样量增加到 0.2g, 加 1mL 的提取液研磨提取。
- 若下降趋势不稳定, 可以每隔 10S 读取一次吸光值, 选取一段线性下降的时间段来参与计算, 相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。
- 若起始值 A1 太大如超过 2 (如颜色较深的植物叶片, 一般色素较高, 则起始值相对会偏高), 可以适当减少样本加样量, 则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。  
或向待测样本中加少许活性炭混匀静置 5min 后 12000rpm, 4℃ 离心 10min, 上清液用于检测。

## 五、结果计算:

### 1、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克组织蛋白每分钟消耗 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$ACL \text{ (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 643.1 \times \Delta A \div Cpr$$

### 2、按样本鲜重计算

酶活定义: 每克组织每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$ACL \text{ (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 643.1 \times \Delta A \div W$$

### 3、按细菌/细胞密度计算:

酶活定义: 每 1 万个细胞每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$ACL \text{ (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 1.29 \times \Delta A$$

### 4、按液体体积计算:

酶活定义: 每毫升液体每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$ACL \text{ (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T = 643.1 \times \Delta A$$

$\epsilon$ ---NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3 \text{ L / mol / cm}$ ;

V: 加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.01 mL;

V2---反应体系总体积,  $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ;

T---反应时间, 10min;

d---96 孔板光径, 0.5cm;

500---细菌或细胞总数, 500 万;

W---样本质量, g;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。